

Л.А.Сафронова

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
тел.: +38(044) 526 23 79, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM*

Целью работы было изучение литической активности пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и возможности использования аминокислот для ее стимуляции. *Методы.* Объектом исследования были штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, составляющие основу лечебно-профилактического препарата эндоспорина. В работе использовали отдельные аминокислоты (DL-) и сухие гидролизатные смеси аминокислот. Активность литических ферментов бацилл определяли турбидиметрическим методом и выражали в процентах снижения оптической плотности суспензии живых клеток тест-культур. *Результаты.* Установлена возможность интенсификации роста и литической активности исследуемых штаммов бацилл по отношению к клеткам грамотрицательных бактерий с помощью смесей аминокислот. Однако более эффективными были отдельные аминокислоты такие как аргинин, аланин, триптофан, гистидин и фенилаланин, которые стимулировали, как рост *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так и синтез ими литических ферментов. При этом степень разрушения клеточных стенок *E. coli* увеличилась более чем на 30–100%, а *S. aureus* в 2,3–4 раза. *Вывод.* Высокая литическая активность бацилл, характеризующая их антимикробные свойства, при условии безвредности споровых бактерий для теплокровных может быть не менее важным показателем, чем их антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам при отборе штаммов для создания пробиотиков.

Ключевые слова: *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, пробиотики, внеклеточные литические ферменты, аминокислоты.

На основе аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* разработаны и с успехом применяются на практике ряд эффективных пробиотических препаратов [3, 7]. Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина [8].

Свойства пробиотиков определяются совокупностью биологических свойств, используемых штаммов микроорганизмов [9, 10]. Одной из основных характеристик пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* является их высокая антимикробная активность, обусловленная синтезом антибиотиков, бактериоцинов и литических энзимов.

© Л.А.Сафронова, 2015



Следует отметить, что литические ферменты бацилл изучены недостаточно и литературные сведения о них ограничены, поэтому остается актуальной задачей получение новых данных, характеризующих их способность к лизису клеточных стенок микроорганизмов – представителей различных таксономических групп.

Бациллы продуцируют литические ферменты типа лизоцима, а также комплекс ферментов, включающий глюканазу, маннаназу, протеазу, ацетилгексозаминидазу, амидазу и другие ферменты, способные разрушать клеточные стенки грамотрицательных микроорганизмов [6].

Одним из перспективных аспектов применения литических ферментов является их использование в качестве антимикробных средств в медицине и ветеринарии для борьбы с патогенными микроорганизмами, устойчивыми к традиционным препаратам [4, 6].

В процессе разработки эффективных пробиотиков важной задачей является не только выявление штаммов микроорганизмов, способных синтезировать биологически активные вещества, полезные для микроорганизма, в том числе и литические ферменты, но и создание условий, благоприятных для их синтеза.

Целью исследования было изучение литической активности пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и возможности использования аминокислот для ее стимуляции.

Материалы и методы

Объектом исследования служили штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139, УКМ В-5140 из коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, составляющие основу лечебно-профилактического препарата эндоспорина [5, 11]. Культивирование штаммов осуществляли на оптимизированной синтетической питательной среде [2]. Для изучения влияния аминокислот на биосинтез литических ферментов была выбрана методика краткосрочных опытов с предварительно выращенными клетками бактерий, чтобы по возможности сократить потребление аминокислот при конструктивном метаболизме. Клетки, выращенные в течение 24 часов, находящиеся в логарифмической фазе роста, отделяли центрифугированием, промывали стерильной водой и ресуспендировали в свежей питательной среде, лишенной источника азота. Аминокислоты первоначально растворяли в дистиллированной воде (рН 6,8–6,9) и стерилизовали при 0,5 атм. Перед проведением опыта растворы аминокислот разбавляли безазотистой синтетической средой. Конечная концентрация каждой аминокислоты в опытной пробе составляла 30 мг% по азоту. В работе использовали отдельные аминокислоты (*DL*-) и сухие гидролизатные смеси аминокислот (САГ) (ТУ 10.16 УССР 40-88). САГ, полученные из отходов мясной промышленности, предоставлены сотрудниками Института биоорганической химии НАН Украины.



Активность литических ферментов определяли турбидиметрическим методом [2] и выражали в процентах снижения оптической плотности (ОП) субстрата – суспензии клеток тест-культуры при инкубации реакционной смеси при температуре 41 °С в течение 60 мин. Измерения проводили на КФК-2 при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм. Литическую активность (%) рассчитывали по формуле

$$\frac{ОД_{исх} - ОДОД_{исх} - ОД}{ОД_{исх} \quad ОД_{исх}} \times 100\%,$$

где $ОД_{исх}$ – оптическая плотность реакционной смеси до инкубации, $ОД$ – оптическая плотность после инкубации.

Как тест-культуры для исследований литической активности бацилл использовали отмытые клетки штаммов *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* 25922 и *Candida albicans* 885/653. Тест-культуры выращивали на МПА в течение 24 ч. Клетки смывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера рН 7,0, суспендировали в том же буфере и доводили ОП суспензии до 0,6–0,7 ед.

Для определения литической активности к 2 мл суспензии тест-культуры добавляли 2 мл отцентрифугированной от клеток культуральной жидкости исследуемых штаммов бацилл и смесь инкубировали при 41 °С в течение 60 мин.

Накопление биомассы клеток оценивали в единицах оптической плотности, регистрируемой на КФК-2 при 540 нм.

Количество спор у бацилл рассчитывали в процентах от общего числа клеток, установленных прямым подсчетом под микроскопом.

Опыты проводили в 3–5 повторностях. Полученные экспериментальные данные обрабатывали, используя компьютерную программу Microsoft Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

Биологическая активность микроорганизмов и синтез ими различных метаболитов, как правило, связана с определенными этапами их развития [1]. Поэтому была изучена динамика роста и образования литических ферментов у пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139, УКМ В-5140 в условиях глубинного культивирования на синтетической питательной среде.

Показано, что литические ферменты синтезируются в основном в логарифмической и начале стационарной фазы. С увеличением количества биомассы возрастает продукция внеклеточных ферментов и их выделение в среду культивирования (рис. 1, 2). Максимальная литическая активность *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 наблюдалась к началу стационарной фазы роста культуры. При этом лизис клеток *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* составил 23, 5 и 34% соответственно (рис. 2). Аналогичная закономерность выявлена и для штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5140. При дальней-



шем культивировании изучаемых продуцентов отмечалось снижение уровня биомассы и уменьшение ферментативной литической активности штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140.

Грамположительные бактерии рода *Staphylococcus* оказались слабо чувствительными к литическому действию ферментов исследуемых штаммов.

Продолжительность культивирования, соответствующая максимальной литической активности составила для *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 – 24 часа, для *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5140 – 18 часов. К этому времени у исследованных штаммов уже заканчивался процесс спорообразования.

В биотехнологии получения эффективных лечебно-профилактических пробиотиков из бацилл главным является достижение максимального выхода биомассы клеток бактерий, спор и синтезируемых бактериальными культурами биологически активных веществ. Эти основные показатели определяют продуктивность, перспективность и рентабельность технологического процесса.

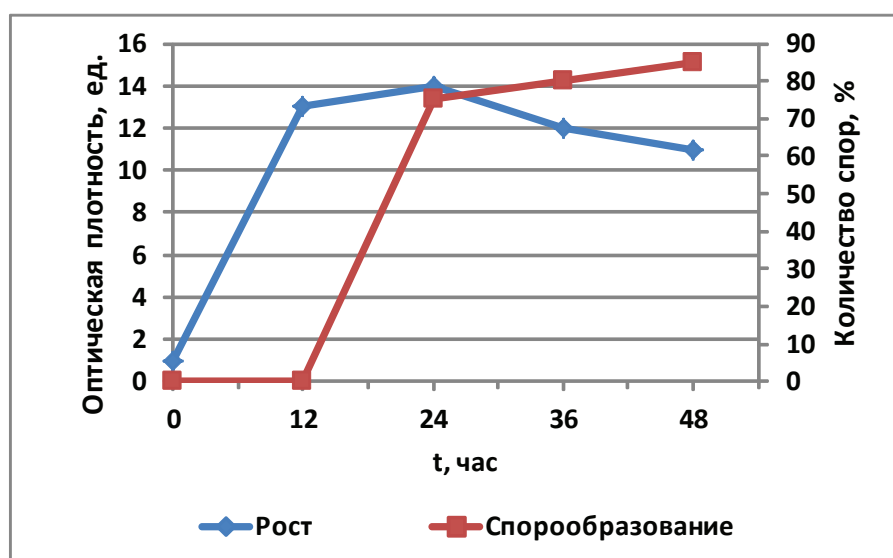


Рис. 1. Динамика роста и спорообразования *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139.

Fig. 1. Dynamics of the growth and sporulation of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139

Проведенные исследования показали, что в логарифмической фазе происходит пропорциональное увеличение как биомассы клеток, так и литической активности исследуемых штаммов бактерий, а в стационарной фазе – интенсивный синтез и выделение в среду внеклеточных ферментов (рис. 1, 2).

Поскольку деградация клеточных стенок тест-микроорганизмов (с разной структурой и связями в строении) и вследствие этого лизис самих клеток

происходит под действием разных ферментов, можно предположить, что исследованные штаммы бацилл синтезируют комплексы литических гидролаз, которые различаются по своим функциональным и физико-химическим свойствам.

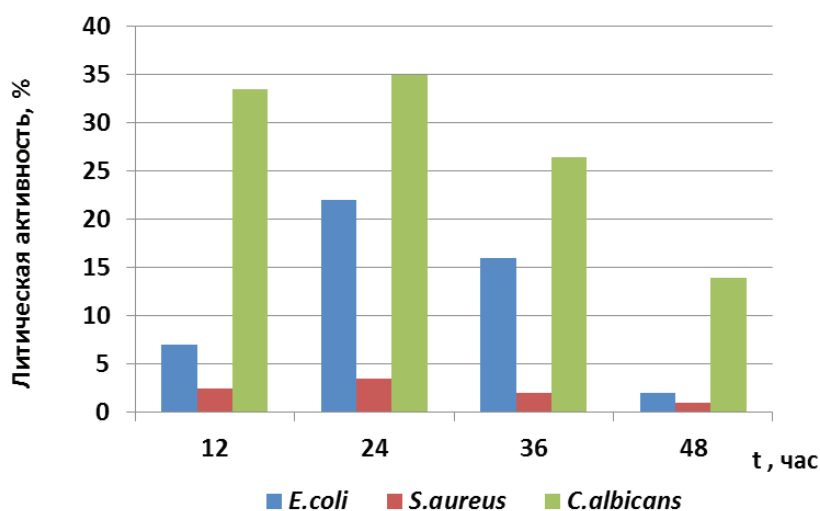


Рис. 2. Динамика литической активности (%) *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 по отношению к тест-культурам

Fig. 2. Dynamics of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic activity (%) in relation to test cultures

Чтобы выяснить, какое действие оказывают аминокислоты на активность внеклеточных литических ферментов у исследуемых штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, в среду культивирования вносили как отдельные аминокислоты, так и их смеси. Как показали результаты экспериментов, отдельные аминокислоты по-разному влияют на степень лизиса клеточных стенок тест-культур (рис. 3).

Так, аргинин, аланин, триптофан, фенилаланин и гистидин стимулировали накопление внеклеточных литических ферментов бактериями *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Внесение в среду названных аминокислот усиливает литическую активность *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 по отношению к клеткам *E. coli* на 34,8–104,3%, по отношению к стафилококку – на 33,3–266,7% по сравнению с активностью в контрольных средах, не содержащих аминокислот. Лизис дрожжевых клеток не стимулировался вообще.

В то же время другие аминокислоты и, прежде всего, валин, цистин, глицин, метионин оказывали репрессивное действие на синтез ферментов, лизирующих клетки бактерий и дрожжей. Вследствие этого литическая активность по отношению к *E. coli*, *C. albicans* и *S. aureus* была ниже на 52,20–65,2%, 35,3–82,4% и 33,3% соответственно, чем в контрольной среде.



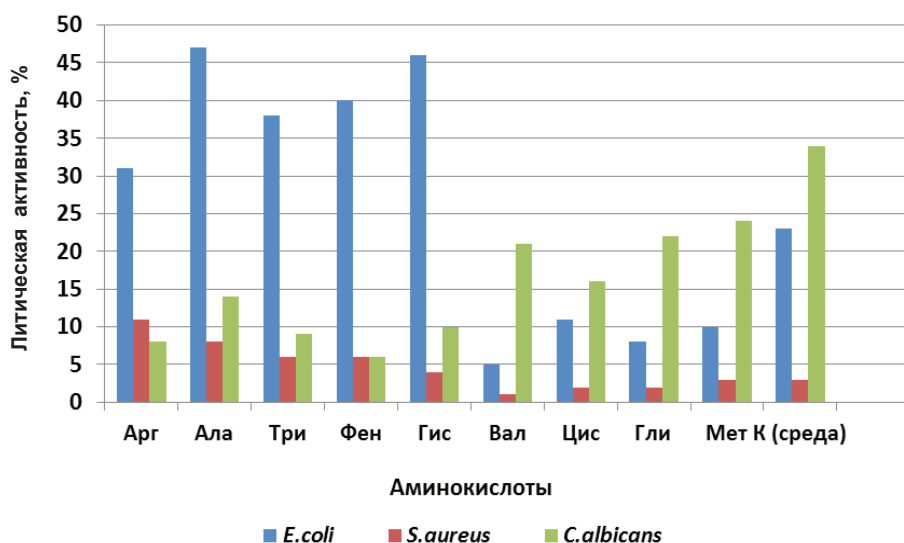


Рис. 3. Изменение литической активности *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 при добавлении в среду культивирования отдельных аминокислот

Fig. 3. Changing of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic activity, when added to the culture medium of single amino acids

При добавлении в питательную среду культивирования аминокислот в виде смесей гидролизатов аминокислот (САГ) заметно стимулировали степень лизиса клеток только грамотрицательных бактерий (рис. 4). Лизис грамположительных бактерий и дрожжей при этом снижался по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что аминокислотам принадлежит важная роль в регулировании активности литических ферментов у пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140. Следовательно, можно предположить, что синтез литических ферментов у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* стимулируется отдельными аминокислотами. Установлена возможность интенсификации роста и литической активности исследуемых штаммов бацилл по отношению к клеткам грамотрицательных бактерий с помощью сухих гидролизатных смесей аминокислот. Однако более эффективными были отдельные аминокислоты такие как аргинин, аланин, триптофан, гистидин и фенилаланин, которые стимулировали, как рост *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так и образование ими литических ферментов. При этом степень разрушения клеточных стенок *E. coli* увеличилась на 30–100%, а *S. aureus* в 2,3–4 раза. Глицин, хотя и стимулировал рост бактерий, но задерживал синтез литического комплекса. Цистин и метионин резко подавляли как рост, так и литическое действие штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

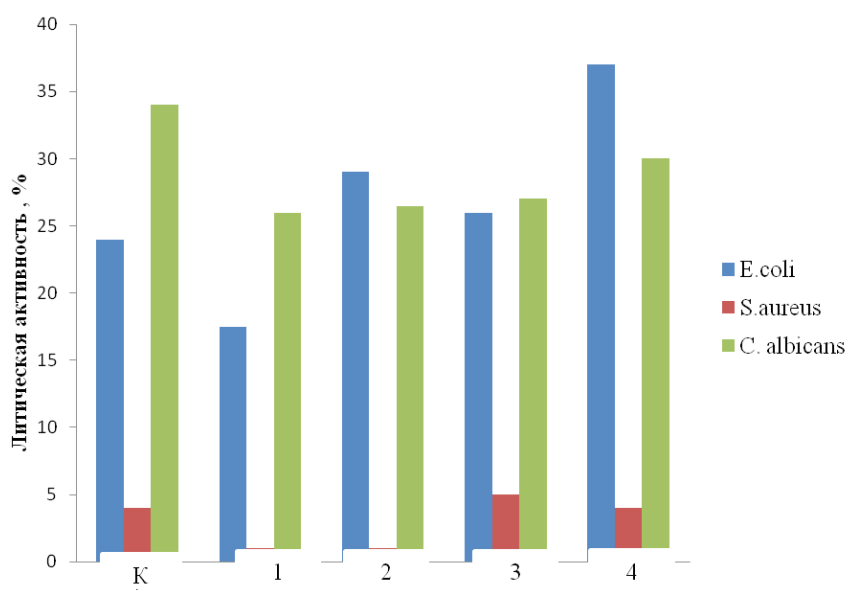


Рис. 4. Влияние комплекса аминокислот на активность литических ферментов у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139.

К – среда без аминокислот; 1 – среда с дрожжевым автолизатом; 2 – среда с САГ– I; 3 – среда с САГ-II; 4 – среда с САГ-III

Fig. 4. Effect of the amino acids complex on the activity of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic enzymes.

К – medium without amino acids; 1 – medium with yeast autolysate; 2 – medium + SAG- I; 3 – medium + SAG-II; 4 – medium + SAG -III

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что высокая литическая активность бацилл, характеризующая их антимикробные свойства, при условии их безвредности для теплокровных может быть не менее важным показателем, чем их антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам при отборе штаммов для создания пробиотиков.

Л.А. Сафронова

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел. : +38 (044) 526 23 79, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТ НА ЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM*

Реферат

Метою роботи було вивчення літичної активності пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* і можливості використання амінокислот для її стимуляції. **Методи.** Об'єктом дослідження були штами бактерій *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 і УКМ В-5140, які складають основу лікувально-профілактичного препарату ендоспорина. В роботі використовували амінокислоти (DL-) і сухі гідролізатні суміші амінокислот. Активність літичних ферментів бацил визначали турбідиметричним методом і виражали у відсотках зниження оптичної густини суспензії живих клітин тест-культур. **Результати.** Встановлена можливість інтенсифікації росту і літичної активності досліджуваних штамів бактерій по відношенню до клітин грамнегативних бактерій за допомогою сумішей амінокислот. Однак, більш ефективними були окремі амінокислоти, такі як аргінін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін, які стимулювали як ріст *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так і синтез ними літичних ферментів. При цьому ступінь руйнування клітинних стінок *E. coli* збільшився більше ніж на 30–100%, а *S.aureus* – в 2,3–4 рази. **Висновок.** Висока літична активність бацил, яка характеризує їх антимікробні властивості, за умови нешкідливості спорових бактерій для теплокровних може бути не менш важливим показником, ніж їх антагоністична активність по відношенню до патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів при відборі штамів для створення пробіотиків.

Ключові слова: *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, позаклітинні літичні ферменти, амінокислоти.

UDC 579.222.3.11

L. A. Safronova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, D 03143, Ukraine,
tel.:+38 (044) 526 23 79, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

EFFECT OF THE AMINO ACIDS UPON LYTIC ACTIVITY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* STRAINS

Summary

The aim of the work was to study the lytic activity of probiotic strains of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and the possibility of using amino acids for its stimulation. **Methods.** The research objects were *B. amyloliquefaciens* subsp.



plantarum UCM B-5139, UCM B-5140 – the basis of therapeutic and prophylactic preparation endosporin. The amino acid (DL-) and dry hydrolyzate mixture of amino acids were used. The lytic enzyme activity of bacilli was determined by the turbidimetric method and expressed as the percentage decrease in the optical density of live cell suspension of the test cultures. **Results.** Stimulation of the growth and lytic activity of studied bacilli strains against Gram negative bacteria cells by the mixtures of amino acids was installed. However, the separate amino acids such as arginine, alanine, tryptophan, histidine and phenylalanine stimulated the growth of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and the synthesis of lytic enzymes were more effective. The degree of destruction of the *E. coli* cell walls increased more than 30–100% and *S. aureus* in 2.3–4 times. **Conclusion.** High lytic activity of bacilli characterizing their antimicrobial properties, provided spore-forming bacteria harmless for warm-blooded may be no less important than their antagonistic activity against pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms in the selection of strains for development of probiotics.

Key words: *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, extracellular lytic enzymes, amino acids.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варбанец Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. – Киев: Наукова думка, 2014. – 325 с.
2. Кудрявцев В.А., Осадчая А.И., Сафронова Л.А. Аэробы рода *Bacillus* как источник продуцентов литических ферментов. // Биотехнология. – 2004, № 4. – С. 24–33.
3. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 20–41.
4. Рязанова Л.П. Действие протеолитических ферментов *Bacillus licheniformis* и лизомидазы *Lysobacter sp.* XL1 на клетки *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*/ Л.П.Рязанова, Л.А.Ледова, Н.В.Цурикова, О.А.Степная, А.П.Синицын, И.С.Кулаев// Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 5. – С. 558–564.
5. Сафронова Л.А., Зеленая Л.Б., Ключко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл-компонентов эндоспорина // Микробиол. журнал. – 2012. – Т. 74. – № 5. – С. 55–66.
6. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities // Bioresource Technology. – 2007. – V. 98. – № 14. – P. 2758–2764.
7. Cutting S.M. *Bacillus* probiotics / Food Microbiology. – 2011. – V. 28. – P. 214–220.
8. *Probiotics and prebiotics – World Gastroenterology Organisation Practice Guideline, 2008* [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf].



9. Sanders M.E. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*/ M.E. Sanders, L. Morelli, T.A. Tompkins //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.— 2003. – V. 2. – P. 101–110.

10. Sorokulova I. Preclinical Testing in the Development of Probiotics: Regulatory Perspective with *Bacillus* Strains as an Example.//Clinical Infectious Diseases. – 2008. – V. 46. – P. 92–95.

11. Пат. № 76669, А61К 35/74, А61Р 31/00. Біопрепарат для лікування та профілактики кишкових та гнійних інфекцій у тварин / Сафронова Л.А., Осадча А.І., Кудрявцев В.О.; заявник і патентовласник Інститут мікробіології і вірусології НАН України. -№ а200504434; заявл.12.05.2006. – Опубл.15.08.2006, Бюл.№ 8.

Стаття надійшла до редакції 03.02.2015 р.

